维生素 B_2 对中华蜜蜂工蜂寿命及学习记忆能力的影响[1]

廖春华 [1,2]　袁　安 [2*]　吴小波 [2**]　郭亚惠 [2]

（1. 江西农业大学生物科学与工程学院，南昌 330045；2.江西农业大学蜜蜂研究所，南昌 330045）

摘　要：本试验旨在研究维生素 B_2 对中华蜜蜂工蜂寿命及学习记忆能力的影响。试验分为工蜂饲养和学习记忆试验 2 部分。工蜂饲养试验：将 1 日龄中华蜜蜂工蜂分成 3 组，每组 5 个重复，每个重复约 200 只。对照组（Ⅰ组）饲喂 1:1 的糖水，2 个试验组在 1:1 糖水的基础上分别添加 100（Ⅱ组）、400 mg/kg(III组）的维生素 B_2，每天记录各组工蜂的死亡情况，直到全部死亡。工蜂学习记忆试验：分组方法同工蜂饲养试验，并按照工蜂饲养方法对 1 日龄工蜂喂养 7 d 后，利用吻伸反应方法测定不同浓度维生素 B_2 对蜜蜂短时学习记忆及长时学习记忆能力的影响，并通过荧光定量 PCR 检测学习成功后蜜蜂学习记忆相关基因的相对表达量。结果表明：工蜂的平均寿命随维生素 B_2 添加量的升高而延长，而且试验组（Ⅱ组、III组）的平均寿命显著高于对照组($P<0.05$)，但Ⅱ组与III组间差异不显著（$P>0.05$）。III组工蜂的长时学习记忆及短时学习记忆能力均显著高于对照组和Ⅱ组($P<0.05$)，而且Ⅱ组工蜂的长时学习记忆能力也显著高于对照组($P<0.05$)。III组工蜂的多巴胺受体基因 2（*Acdop*3）、cAMP 反应元件结合蛋白（*AcCRE*B）相对表达量均显著高于对照组和Ⅱ组（$P<0.05$），而且Ⅱ组工蜂的 *Acdop*3 相对表达也显著高于对照组（$P<0.05$)。由此得出，维生素 B_2 影响中华蜜蜂工蜂的寿命及学习记忆能力，在人工饲喂蜂群时需要提供适量的维生素 B_2。

关键词：中华蜜蜂；维生素 B_2；寿命；吻伸反应

中图分类号：S816　　文献标识码：A　　文章编号：

蜜蜂作为一种重要的经济昆虫，与畜禽等动物一样也存在营养需要。研究蜜蜂营养需要，制订科学合理的饲养标准，不但有利于蜜蜂的生长发育，增强蜜蜂抗病能力，而且有利于维持蜂群最佳生产状态，提高蜂产品的产量和质量[1]。群势强是获取蜂产品高产的基础，而强群意味着蜜蜂（工蜂）多。强群需要 2 个基本要素，即蜜蜂繁殖快和寿命长，达到个体的高

收稿日期：2016-03-14

基金项目：国家自然科学基金项目（31360587）

作者简介：廖春华（1992—），男，四川德阳人，本科，生物科学专业。E-mail: 398376812@qq.com

*同等贡献作者

**通信作者：吴小波，讲师，E-mail: wuxiaobo21@163.com

积累[2]。因此，人工改善蜜蜂的营养条件，使蜜蜂的生存寿命加以延长，必然会给蜂农带来更高的经济收益。近年来，蜜蜂营养研究取得了阶段性成果，主要包括蜜蜂不同发育时期蛋白质、维生素 A、维生素 C、氨基酸、矿物质等营养需要，为养蜂饲料生产提供了重要参考资料[3-17]。核黄素（riboflavin）又称维生素 B_2，在动物机体内转化为黄素单核苷酸（FMN）和黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD），参与构成各种黄素酶的辅基，在生物氧化过程中作为递氢体，与糖、脂肪和蛋白质的代谢密切相关[18]，是机体组织代谢和修护的必需营养元素。本研究旨在分析维生素 B_2 对中华蜜蜂工蜂寿命及学习记忆能力的影响，为合理配制蜜蜂饲粮提供一定的理论数据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验动物为江西农业大学蜜蜂研究所饲养的中华蜜蜂（*Apis cerana cerana*）工蜂。

1.2 主要试剂及器材

维生素 B_2（纯度≥98%，美国 Supelco 公司)，柠檬香精和香草香精(食品级，澳大利亚皇后食品公司)，蔗糖和氯化钠（分析纯，西陇化工股份有限公司），Trizol 总 RNA 提取试剂盒和 RNA 酶抑制剂（北京全式金公司），dNTP Mixture 和 Oligo(dT)由上海英杰公司合成，M-MLV 反转录酶和荧光染料 SYBR® Premix Ex Taq™ II 购自 TaKaRa 公司。自制小木箱（11 cm×13 cm×15 cm)，生化培养箱（GZ-250-GSI 型，韶关市广智科技设备发展公司），定量 PCR 仪(iQTM2 型，美国 Bio-Rad 公司)，核酸蛋白测定仪(NanoPhotometerTM P300，德国 Implen 公司)。

1.3 试验设计

1.3.1 工蜂饲养试验

选取群势相同的中华蜜蜂 4 群，隔王控制蜂王产卵。将快要出房的封盖子放入恒温恒湿箱（34 ℃，相对湿度 75%）中羽化。将刚羽化的 1 日龄工蜂平均分成 3 组，每组 5 个重复，每个重复约 200 只，放入恒温恒湿箱（34 ℃，相对湿度 75%）中继续饲养。其中对照组（Ⅰ组）饲喂 1:1 的糖水，2 个试验组在 1:1 糖水的基础上分别添加 100（Ⅱ组）、400 mg/kg (III 组）的维生素 B_2，各组糖水现用现配。每 24 h 更换 1 次食物，保证足够的食物。首次饲喂 24 h 后清除死亡的蜜蜂，之后统计每天死亡的蜜蜂数量并及时清除，直到蜜蜂全部死亡[14]。

1.3.2　工蜂学习记忆试验

分组方法同工蜂饲养试验，并按照工蜂饲养方法对 1 日龄工蜂喂养 7 d 后，用干冰进行冷冻处理并固定在 U 型管中，放入恒温恒湿箱（37 ℃，相对湿度 75%）中饥饿 2 h。之后取出工蜂，剔除状态不佳的蜜蜂，再进行蜜蜂学习记忆训练与检测。蜜蜂训练时，分别用含有柠檬气味的糖水和香草气味的盐水对每只蜜蜂进行正刺激和负刺激，使蜜蜂将柠檬与糖水和香草与盐水联系起来。每只蜜蜂每隔 6 min 重复训练 1 次，共 3 次。蜜蜂训练后 6 和 24 h 分别进行短时记忆和长时记忆能力检测。先给予负刺激，再给以正刺激，检测蜜蜂伸吻情况，每只蜜蜂检测 3 次，并进行统计分析[19-20]。

1.3.3　工蜂记忆相关基因相对表达量的测定

1.3.3.1　样品采集

采集工蜂学习记忆试验中正确伸吻的蜜蜂，每组采集 20 只，分别装入 1.5 mL RNase-free 的 EP 管迅速放入液氮中，用于后续检测。

1.3.3.2　总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

每个组取 4 只蜜蜂，放入含液氮的坩埚中进行研磨，研磨成粉末后转入装有 1 mL Trizol 的 1.5 mL 的 EP 管中，然后对样品总 RNA 进行提取，提取的总 RNA 用核酸蛋白测定仪测定 OD260/280 值和 RNA 浓度，每个组测 3 次，取平均值。

用反转录试剂盒对总 RNA 进行反转录，反应体系为 50 μL：8 μL 总 RNA，10 μL Buffer，8 μL dNTP Mixture，1.5 μL M-MLV 反转录酶，3 μL Oligo(dT)，1 μL RNA 酶抑制剂，18.5 μL DEPC 水。反转录反应条件如下：体系混匀后，42 ℃反应 60 min，75 ℃灭活 5 min。反转录产物保存于-80 ℃。

1.3.3.3　荧光定量 PCR 引物的设计及荧光定量 PCR

引物设计：参照从东方蜜蜂大脑组织中克隆的多巴胺受体基因 2（*Acdop*2，登录号 KC814691）、多巴胺受体基因 3（*Acdop*3，登录号 KC814692）和 cAMP 反应元件结合蛋白(*AcCREB*，登录号 KC814690)的 mRNA 序列，用 Primer 5.0 软件设计引物序列(表 1)，以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（*GADPH*）和 β-肌动蛋白（β-actin）作为内参基因。

荧光定量 PCR 反应体系（10 μL）：cDNA 1 μL，SYBR® Premix Ex Taq™ Ⅱ 5 μL，上游、下游引物各 0.4 μL，超纯灭菌水 3.2 μL，混匀，放入定量 PCR 仪中进行扩增。反应条

件：95 ℃ 30 s，95 ℃ 10 s，60 ℃ 1 min，40 个循环；之后 50 ℃加热到 90 ℃（每 6 s 升高 1 ℃）建立熔解曲线，利用 Bio-Rad CFX 2.1 软件收集目的基因与内参基因的 Ct 值[12]，通过 qPCR package 和 Ct 值计算每个技术重复的扩增效率，每个生物学样本包括 3～5 个技术重复，并参考 Huang 等[21]的方法计算各个目的基因的相对表达量。

表 1　荧光定量 PCR 引物

Table 1　Primers used in real time quantitative PCR

基因名称 Gene names	正向引物 Forward primer (5′-3′)	反向引物 Reverse primer (5′-3′)
cAMP 反应元件结合蛋白 *AcCREB*	TGAAAATCCAGTTTGATCATTCGAT	TTCAAATAATCAGCAAATCATGCAC
多巴胺受体基因 2 *Acdop*2	TTGGTTCTCCCTCTCTCCGA	ACTGTGCGTGTTATTGCGTTC
多巴胺受体基因 3 *Acdop*3	AGAAGGACAAGAAAAATGCCG	CCAAGAGGTCACTATGAATGCG
β-肌动蛋白 β-actin	GGC TCC CGA AGA ACA TCC	TGC GAA ACA CCG TCA CCC
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 *GAPDH*	GCTGGTTTCATCGATGGTTT	ACGATTTCGACCACCGTAAC

1.4　数据处理

用 SPSS 20.0 软件对试验数据进行统计分析，以 P<0.05 作为差异显著性判断标准。

2　结　果

2.1　维生素 B_2 对中华蜜蜂工蜂寿命的影响

试验结果如表 2 所示，工蜂的平均寿命随着维生素 B_2 添加量的升高而增加，而且试验组（II 组和III组）的平均寿命显著高于对照组（P<0.05），但 2 个试验组之间差异不显著（P>0.05）。工蜂寿命的中位数也随着维生素 B_2 添加量的升高而增加。

表 2　维生素 B_2 对中华蜜蜂工蜂寿命的影响

Table 2　Effects of vitamin B_2 on lifespan of worker bees for *Apis cerana cerana*

组别 Groups	平均寿命 Average lifespan	中位数 Median
I	13.995±0.221[a]	14
II	18.566±0.341[b]	18
III	21.381±0.315[b]	22

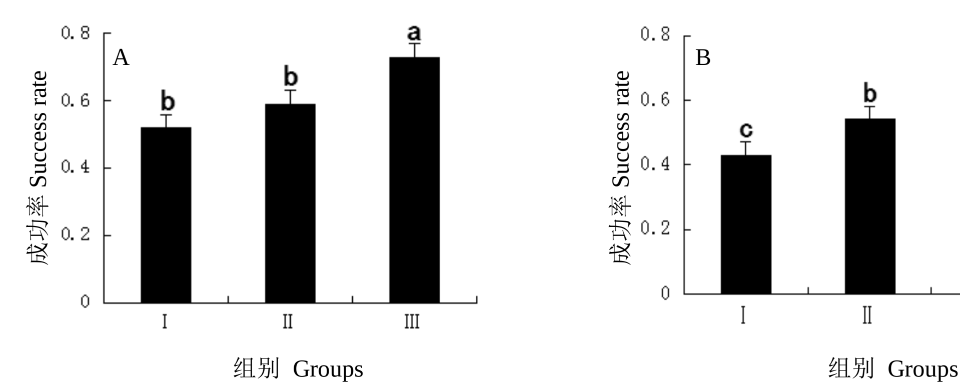
同列数据肩标相同字母表示差异不显著（P>0.05），不同字母表示差异显著（P<0.05）。

Values in the same column with the same letter superscripts mean no significant difference（P>0.05), while with different letter superscripts mean significant difference （P<0.05）.

2.2　维生素 B_2 对中华蜜蜂工蜂学习记忆能力的影响

试验结果如图 1 所示，III组工蜂的短时学习记忆和长时学习记忆能力均显著高于对照组

和Ⅱ组(P＜0.05)，而且Ⅱ组工蜂的长时记忆能力也显著高于对照组(P＜0.05)。



数据柱标注相同字母表示差异不显著（P>0.05），不同字母表示差异显著（P<0.05）。下图同。

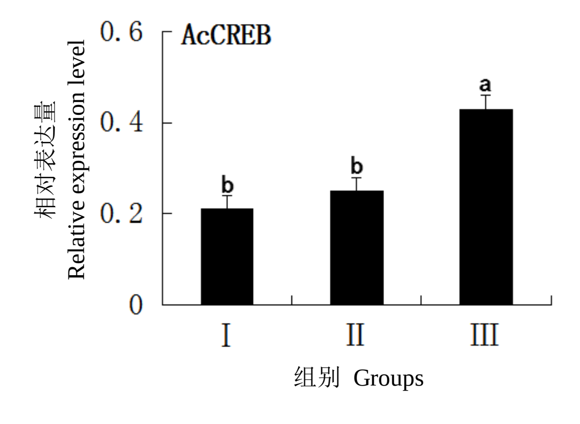
Date columns with the same letters mean no significant difference （P>0.05）, while with different letters mean significant difference （P<0.05）. The same as below.

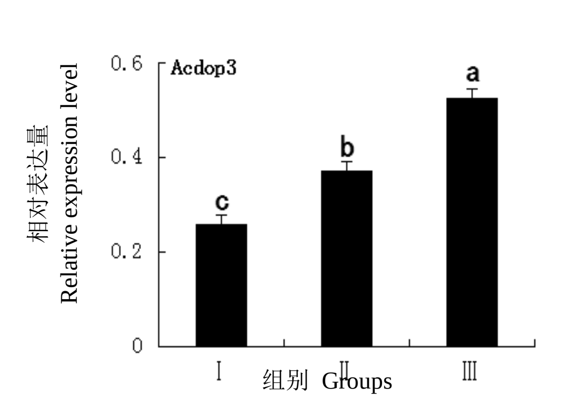
图 1　维生素 B_2 对中华蜜蜂工蜂学习短时记忆（A）和长时学习记忆（B）能力的影响

Fig.1　Effects of vitamin B_2 on short-term （A） and long-term（B） learning memory abilities of worker bees for *Apis cerana cerana*

2.3　维生素 B_2 对中华蜜蜂工蜂学习记忆相关基因相对表达量的影响

试验结果如图 2 所示，Ⅲ组工蜂的 *Acdop*3 和 *AcCREB* 相对表达量均显著高于对照组和Ⅱ组（P＜0.05)，而且Ⅱ组的 *Acdop*3 相对表达量也显著高于对照组（P＜0.05)。2 个试验组的 *Acdop*2 相对表达量与对照组差异不显著（P>0.05）。





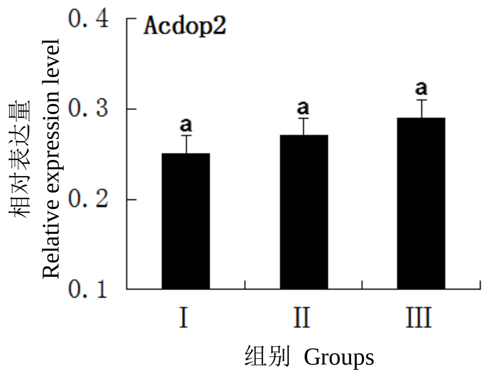


图 2　维生素 B_2 对中华蜜蜂工蜂学习记忆相关基因相对表达量的影响

Fig.2 Effects of vitamin B_2 on relative expression levels of learning memory related genes of worker bees for *Apis cerana cerana*

3 讨 论

蜜蜂营养对于蜜蜂正常生长与繁殖起着重要的作用，也一直受到广大蜂农的关注。蜂农经常在饲料中添加各种维生素，其中包括维生素 B_2。维生素 B_2 是自然界分布广泛的一种维生素，它能够参与构成各种黄素酶的辅基，在生物氧化过程中作为递氢体，与糖、脂肪和蛋白质的代谢密切相关。当蜜蜂生命周期中缺乏维生素 B_2 时，必然影响机体的生物氧化，使代谢发生障碍。本试验通过在饲粮中添加不同浓度的维生素 B_2 来分析维生素 B_2 对中华蜜蜂工蜂寿命及学习记忆能力的影响，结果发现中华蜜蜂工蜂的平均寿命随着维生素 B_2 添加量的增加而升高，主要原因在于维生素 B_2 参与了蜜蜂体内的生物氧化，提高体内糖、脂肪和蛋白质的代谢能力，有利于蜜蜂个体的生长发育，延长蜜蜂个体的寿命，从而增加了蜜蜂的群势，提高了蜜蜂的生产力。

蜜蜂的学习记忆能力与蜜蜂出巢试飞以及采集花蜜、花粉后的归巢能力密切相关。蜜蜂的记忆能力越强，其出巢后正确归巢能力就越强，从而能提高获取天然原料的能力，增加蜂产品的产量。本研究发现：III组的工蜂的短时学习记忆和长时学习记忆能力均显著高于对照组和II组，而且II组工蜂的长时记忆能力也显著高于对照组，说明维生素 B_2 能提高蜜蜂的学习记忆能力，而且以高浓度维生素 B_2 的效果更好。另外，学习记忆是一种行为过程。AcCREB 的主要功能是调节特定基因的转录，增强细胞间的联系，影响神经元的发育和再生，并参与机体内记忆能力[22]。多巴胺是动物中枢神经系统内重要的神经递质，参与调控昆虫的多种行为和生理过程，包括学习记忆等，其中，Acdop3 激活后能引起脑部 cAMP 的变化，引起记忆的产生[23]。本研究发现：III组工蜂记忆相关基因 *Acdop*3 和 *AcCREB* 的相对表达量均显著高于对照组和II组，而且II组的 *Acdop*3 相对表达量也显著高于对照组，说明维生素 B_2 影响着蜜蜂习记忆相关基因的表达，而且饲喂高浓度维生素 B_2 饲粮的蜜蜂的记忆相关基因的相对表达量最高，这与蜜蜂学习记忆能力结果一致，进一步说明蜜蜂饲粮中维生素 B_2 的浓度影响着蜜蜂学习记忆相关基因的表达以及其学习记忆能力。另外，2 个试验组和对照组蜜蜂的 *Acdop*2 相对表达量差异不显著，可能是该基因的表达与蜜蜂的运动行为有关，具体原因有待于进一步研究与分析。

4 结 论

维生素 B_2 影响中华蜜蜂工蜂的寿命及学习记忆能力，在日常饲喂蜂群时需要提供适量的维生素 B_2。

参考文献：

[1] 王颖,马兰婷,胥保华.蜜蜂营养需要研究的必要性及策略[J].动物营养学报,2011,23(8):1269–1272.

[2] 李位三.延长蜜蜂寿命的理论和实践[J].蜜蜂杂志,2012(8):9–12.

[3] BRODSCHNEIDER R,CRAILSHEIM K.Nutrition and health in honey bees[J].Apidologie,2010,41(3):278–294.

[4] 刘俊峰,吴小波,颜伟玉,等.饲粮蛋白水平对中华蜜蜂春繁性能及幼虫抗氧化性能的影响[J].江西农业大学学报,2011,33(5):960–964.

[5] 王改英,李振,杨维仁,等.日粮蛋白质水平对浙农大 1 号意大利蜜蜂产浆及咽下腺发育的影响[J].江西农业大学学报,2011,33(6):1176–1180.

[6] 冯倩倩,杨维仁,胥保华,等.维生素 E 对意大利蜜蜂产浆性能及抗氧化性的影响[J].福建农林大学学报:自然科学版,2011,40(6):632–635.

[7] 李成成,杨维仁,胥保华,等.意大利蜜蜂生长发育适宜蛋白供给水平及其对幼虫抗氧化活性的影响[J].中国农业科学,2011,44(22):4714–4720.

[8] FARJAN M,DMITRYJUK M, LIPIŃSKI Z,et al.Supplementation of the honey bee diet with vitamin C:the effect on the antioxidative system of *Apis mellifera carnica* brood at different stages[J].Journal of Apicultural Research,2012,51(3):263–270.

[9] 王改英,杨维仁,胥保华.饲粮蛋白质水平对蜂群繁殖性能的影响[J].应用昆虫学报,2012,49(2):486–489.

[10] 冯倩倩,杨维仁,胥保华,等.不同水平维生素 A 对意大利蜜蜂春繁阶段群势及幼虫抗氧化性的影响[J].中国农业科学,2012,45(17):3584–3591.

[11] FARJAN M,ŁOPIEŃSKA-BIERNAT E,LIPIŃSKI Z,et al.Supplementing with vitamin C the diet of honeybees (*Apis mellifera carnica*) parasitized with *Varroa destructor*:effects on antioxidative status[J].Parasitology,2014,141(6):770–776.

[12] WANG W X,TIAN L Q,HUANG Q,et al.Effects of 10-Hydroxy-2-decenoic acid on the development of honey bee (*Apis mellifera*) larvae[J].Journal of Apicultural

Research,2014,53(1):171–176.

[13] 董文滨,马兰婷,王颖,等.意大利蜜蜂春繁、产浆、越冬和发育阶段营养需要建议标准[J].动物营养学报,2014,26(2):342–347.

[14] 韩旭,田柳青,王子龙,等.维生素C对中华蜜蜂幼虫发育及工蜂生存能力的影响[J].动物营养学报,2014,26(5):1265–1271.

[15] 张怡丁,张卫星,胥保华,等.人工饲养条件下意大利蜜蜂幼虫饲粮的适宜粗蛋白质水平[J].动物营养学报,2014,26(9):2722–2729.

[16] 陈顺安,张学文.不同花粉对越冬蜜蜂群势和存活率的影响[J].动物营养学报,2014,26(5):1402–1406

[17] 王圣伟,胥保华,王红芳.意大利蜜蜂工蜂幼虫饲粮中亚油酸的适宜添加水平[J].动物营养学报,2015,27(5):1440–1449.

[18] 王宝维,王鑫,葛文华,等.维生素 B_2 对5～16周龄五龙鹅生长性能、血清激素含量和肠道组织结构的影响[J].动物营养学报,2014,26(3):637–645.

[19] Li Z G,CHEN Y P,ZHANG S W,et al.Viral infection affects sucrose responsiveness and homing ability of forager honey bees,*Apis mellifera* L.[J].PLoS One,2013,8(10):e77354.

[20] WANG Z L,WANG H,QIN Q H,et al.Gene expression analysis following olfactory learning in *Apis mellifera*[J].Molecular Biology Reports,2013,40(2):1631–1639.

[21] HUANG Q,KRYGER P,CONTE Y L,et al.Survival and immune response of drones of a Nosemosis tolerant honey bee strain towards *N.ceranae* infections[J].Journal of Invertebrate Pathology,2012,109(3):297–302.

[22] YIN J C P,DEL VECCHIO M,ZHOU H,et al.CREB as a memory modulator:induced expression of a *dCREB*2 activator isoform enhances long-term memory in *Drosophila*[J].Cell,1995,81(1):107–115.

[23] 吴顺凡,徐刚,齐易香,等.昆虫多巴胺及其受体的研究进展[J].昆虫学报,2013,56(11):1342–1358.

Effect of Vitamin B_2 on Lifespan and Learning Memory Ability of Worker Bees for *Apis cerana*

cerana

LIAO Chunhua[1,2] YUAN An[2*] WU Xiaobo[2**] GUO Yahui[2]

(1. *College of Bioscience and Bioengineering*, *Jiangxi Agricultural University*, *Nanchang* 330045, *China*; 2. *Honeybee Research Institute*, *Jiangxi Agricultural University*, *Nanchang* 330045, *China*)

Abstract: The objective of this experiment was to explore the effects of vitamin B_2 on the lifespan and learning memory of worker bees for *Apis cerana cerana*. The experiment includes two parts: worker bees' feeding and learning memory trails. Worker bees' feeding trail: one-day-old worker bees for *Apis cerana cerana* were distributed in to 3 groups with 5 replicates in each group and about 200 bees in each replicate. The worker bees in control group (group Ⅰ) were fed a 1:1 sweet water, and those in two experimental groups were fed 1:1 sweet water supplemented with 100 (group Ⅱ) and 400 mg/kg vitamin B_2 (group Ⅲ), respectively. The death status of worker bee in each group was recorded daily until all the bees died. Worker bees' learning memory trail: grouping method the same as worker bees' feeding trail, and one-day-old worker bees for *Apis cerana cerana* were fed 7 days by the feeding method and the ability of short-term and long-term learning memory of worker bees were tested by PER method. Meanwhile, the relative expression levels of the learning memory related genes were tested by real time quantitative PCR method. The results showed as follows: The average lifespan of worker bees was prolonged with the increase of vitamin B_2 supplemental level. The average lifespan of worker bees in experimental groups (groups Ⅱ and Ⅲ) was significantly higher than that in control group ($P<0.05$), and there was no significant difference between the two experimental groups （$P>0.05$）. The abilities of short-term and long-term learning memory of worker bees in group Ⅲ was significantly higher than that in control group and group Ⅱ ($P<0.05$), while the ability of long-term learning memory of worker bees in group Ⅱ was significantly higher than that in control group ($P<0.05$). Moreover, the relative expression levels of dopamine receptor gene 3 （*Acdop*3） and cAMP responsive element binding protein （*AcCREB*） in group Ⅲ was significantly higher than those

*Contributed equally

**Corresponding author, lecturer, E-mail: wuxiaobo21@163.com

in control group and group Ⅱ （$P<0.05$）, while the relative expression level of *Acdop*3 in group Ⅱ was significantly higher than that in control group ($P<0.05$). In conclusion, dietary vitamin B_2 affects the lifespan and learning memory of worker bees for *Apis cerana cerana* and we should provide the suitable amount of vitamin B_2 in the artificial diet of honeybee colonies.

Key words: *Apis cerana cerana*; vitamin B_2; lifespan; PER